

Expressionsanalyse antennaler ionotroper Rezeptoren des Tabakswärmers (*M. sexta*)

Bachelorarbeit

Vorgelegt an der Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena

Fachbereich Medizintechnik/Biotechnologie

Studiengang Biotechnologie

Angefertigt am

Max-Planck-Institut für chemische Ökologie

In der Abteilung evolutionäre Neuroethologie in Jena

Hochschulbetreuer: Prof. Meyer

Bearbeitet von: Robert Schwarz

Matrikelnummer: 715276

Studiengang: Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Material.....	6
2.1.1 Chemikalien	6
2.1.2 Größenmarker DNA	8
2.1.3 Enzyme, Kits, Plasmide	8
2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer.....	9
2.1.5 Analyse-Software und Bearbeitungs-Software	12
2.1.6 Geräte und Laborausstattung.....	13
2.1.7 Verbrauchsmaterial	14
2.1.8 Versuchstiere	14
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Sequenzanalyse.....	15
2.2.2 Polymerase Kettenreaktion	15
2.2.3 Gel-Elektrophorese	17
2.2.4 Geextraktion	17
2.2.5 Erstellung kompetenter Zellen	18
2.2.6 Ligation.....	18
2.2.7 Transformation	19

2.2.8	Kolonie-PCR.....	19
2.2.9	Plasmidisolierung.....	19
2.2.10	Sequenzierung	20
2.3	<i>In-Situ</i> Hybridisierung.....	20
2.3.1	Synthese der Sonden	20
2.3.2	Gewebeschnitte	22
2.3.3	RNA-Hybridisierung	22
2.3.4	Konfokal Mikroskopie	24
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Evolutionäre Beziehung antennaler ionotroper Rezeptoren.....	25
3.2	Charakterisierung antennaler ionotroper Rezeptoren	26
3.3	Quantitative Expressionsanalyse	26
3.4	Auswertung Sequenzierung	28
3.5	Räumliche Expression des Ionotropen Rezeptors 8a.....	31
4	Diskussion	33
5	Literaturverzeichnis	VII
	Danksagung.....	IX
	Ehrenwörtliche Erklärung	X

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Sensilla coeloconica	3
Abb. 2 Schematische Darstellung von iGluR und IR	4
Abb. 3 Dendrogramm der antennalen ionotropen Rezeptoren.....	25
Abb. 4 Agarose-Gelbild der PCR-Produkte	27
Abb. 5 Agarose-Gelbild der geschlechtsspezifischen PCR-Produkte.....	28
Abb. 6 Ergebnis der Sequenzierung.....	30
Abb. 7 Lokalisation des IR8a mittel <i>in-situ</i> -Hybridisierung.....	31
Abb. 8 Doppel <i>in-situ</i> -Hybridisierung des IR8a und ORCO	32

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Ansatz für RT-PCR.....	16
Tab. 2 Übersicht der Primer und ihrer Anlagerungstemperatur	16
Tab. 3 Pipettierschema Ligationsansatz	18
Tab. 4 Zentrifugationsschritte für die Eluierung der DNA	20
Tab. 5 Pipettierschema für die RNA-Synthese.....	20
Tab. 6 Waschschrirte der Objektträger	22
Tab. 7 Konzentration der Plasmide nach der DNA Extraktion.....	29

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Amp	Ampicilin
Art. Nr.	Artikelnummer
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i> (Seidenspinner)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotid (5') Triphosphat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (Taufliege)
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
et al	und andere
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> -Hybridisierung
for	Vorwärtsorientiert
GR	gustatorischer Rezeptor
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
IR	ionotroper Rezeptor
kb	Kilobasen
LB	Luria Bertani
M	Molar [mol/liter)
<i>M. sexta</i>	<i>Manduca sexta</i> (Tabakswärmer)
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter

min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	Boten- (messenger-)Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
OR	olfaktorischer Rezeptor
ORN	olfaktorisches Rezeptorneuron
pmol	pikomol
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
rev	Rückwärtsorientiert
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT-PCR	real time Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunde
SSC	Kochsalzlösung Natriumcitrat
SOC	Super optimal broth, Nährmedium
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

Der olfaktorische Sinn vermittelt die Fähigkeit, unterschiedliche Duftstoffe zu detektieren und zu diskriminieren (Hildebrand & Shepherd, 1997). In Insekten werden so unter anderem chemische Reize von Futterquellen oder Gefahrstoffen verortet, ebenso werden Duftstoffe zur Kommunikation, wie z.B. der Werbung geeigneter Geschlechtspartner genutzt. Der Geruchssinn hat daher einen großen Einfluss auf Überleben und Fortpflanzung eines Individuums, weswegen er seit dem Ende des 19. Jahrhunderts erforscht wird (Rezaval, Fabre, & Goodwin, 2011).

In der Erforschung der Olfaktorik haben sich in dieser Zeit mehrere Modellorganismen etabliert. Einer der wichtigsten ist die Taufliege *D. melanogaster*. Ihre Vorteile sind die gegebenen genetischen und molekularen Werkzeuge die zur Verfügung stehen, sowie die Einfachheit des olfaktorischen Systems (Vosshall & Stocker, 2007). Weitere Modellsysteme sind verschiedene Spezies der Lepidoptera. Ihr Vorteil ist die Relevanz im Kontext der Evolution komplexer Interaktionen innerhalb von Ökosystemen, sowie auffällige und damit einer Analyse gut zugängliche Verhaltensweisen. Die Verhaltensvielfalt sowie die ökologische Vielfalt der Lepidoptera ermöglicht so umfassende Untersuchungen (Pierce et al., 2002). Seit der ersten erfolgreichen Isolierung und Identifizierung eines Pheromons im Seidenspinner *Bombyx mori* (Butenandt et al., 1959) sind die Lepidoptera zu einem Fokus olfaktorischer Forschung geworden. Allerdings ist ein Nachteil von *B. mori* als Forschungsobjekt, dass es sich um eine Zuchtart handelt die nicht in der freien Natur vorkommt, diese Spezies wurde mehr als laborgerechte Art die näher zu natürlichen Lepidoptera verwandt ist als *Drosophila* eingesetzt. Die Tiere sind blind, können nicht fliegen und sind somit als Modell für komplexere Verhaltensweisen natürlicher Arten nicht geeignet. Daher haben sich weitere Modelle in der Olfaktionsforschung etabliert, vor allem der Tabakswärmer *Manduca sexta*. *M. sexta* ist dato ein sehr gründlich studierter Organismus, der in einem ökologischen Zusammenhang ein komplexes Verhalten an den Tag legt. Dabei integrieren die Tiere Informationen von Geruchs- und Lichtsinn (Goyret, Kelber, Pfaff, & Raguso, 2009).

Das primäre olfaktorische Organ von Insekten sind die Antennen. Bei *M. sexta* bestehen diese aus drei Teilen, zwei basalen und einem Flagellum. Das Flagellum ist in ungefähr 80 Untereinheiten unterteilt (Sanes & Hildebrand, 1976). Auf der Antenne befinden sich zahlreiche Sensillen unterschiedlichen morphologischen Typs (Shields & Hildebrand, 1999a). Beide Geschlechter von *M. sexta* besitzen die verschiedenen Typen dieser Sensillen: je zwei Sensilla trichoidea, basiconica, chaetica und coeloconica (Lee & Strausfeld, 1990; Shields & Hildebrand, 1999a). Auf den Sensillen befinden sich Poren welche Duftstoffe in das Innere der Sensille gelangen lassen (Rospars, 1988). Innerhalb der Sensille befinden sich hierbei die Dendriten der olfaktorischen sensorischen Neurone (OSN) (Hallem, Dahanukar, & Carlson, 2006). Die Zellkörper der OSNs liegen unterhalb der Sensillenbasis, umgeben von Hüllzellen (thekogene Zellen, tormogene Zellen und trichogene Zellen).

Das Augenmerk dieser Arbeit liegt auf den Sensillen coeloconica. Sie sind deutlich kleiner als andere genannte Sensillentypen, und es befinden sich im Vergleich deutlich weniger dieser Sensilla coeloconica auf der Antenne (Shields & Hildebrand, 1999b). Es gibt zwei Typen der Sensilla coeloconica, Typ A und Typ B. Typ A ist im Vergleich zu Typ B doppelwandig (Shields & Hildebrand, 1999b). Sensillen des Typ A befinden sich auf der ventralen, dorsalen und der führenden Oberfläche der Antenne (Shields & Hildebrand, 1999b). Sensillen des Typ B befinden sich nur auf der dorsalen und der führenden Oberfläche (Shields & Hildebrand, 1999b). Allerdings besteht hier eine Geschlechtsspezifität, Typ A kommt nicht auf der führenden Oberfläche der Männchenantenne, Typ B nicht auf der dorsalen Seite der Männchen bzw. der führenden Oberfläche der Weibchenantenne vor (Shields & Hildebrand, 1999b).

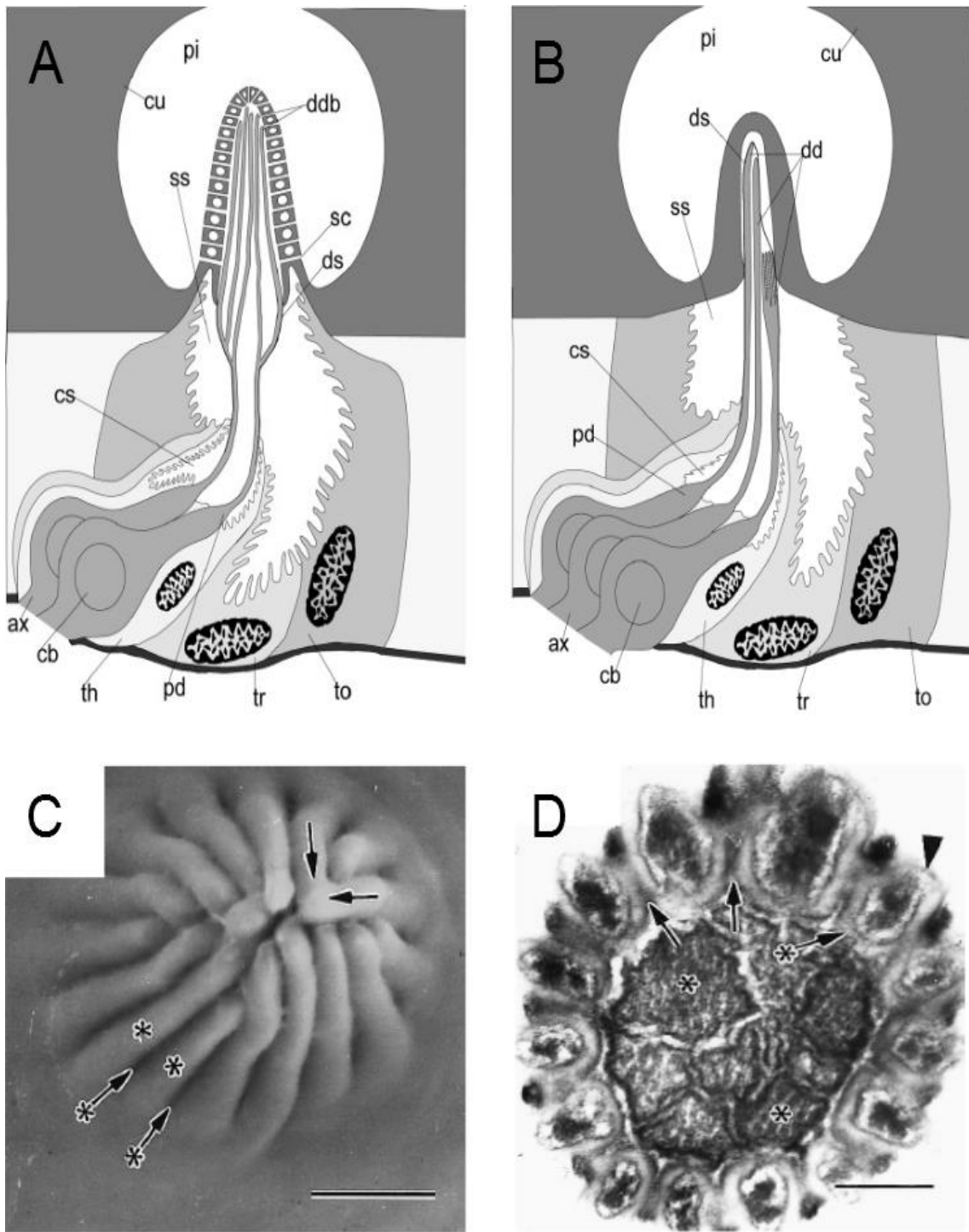


Abb. 1 Sensilla coeloconica – A-B: Schematische Darstellung Sensilla coeloconica Typ A (A) und die des Typ B (B). ax, Axon; cb, Zellkörper; cs, Ziliar sinus; cu-Kutikula, ds-dendritischer Mantel, dd-distaler Dendrit, ddb-distale dendritische Äste, pi-Vertiefung, pd- proximaler Dendrit, sc-Kanal, ss-sesillarer sinus, th-thekogene Zelle, to-tormogene Zelle, tr-trichogene Zelle. C: Draufsicht Sensilla coeloconica Typ A. Zu sehen sind 16 längslaufende Käme (Sternchen) und Rillen (Pfeil mit Sternchen) sowie die Spitzen der Käme welche zusammenlaufen (Pfeil). Maßstab 0,5 μm . D: Querschnitt Sensilla coeloconica Typ A. Zu Sehen ist die glatte Innenwand (Pfeil mit Sternchen) und die äußere geriffelte Wand (Pfeilkopf). Die kreisförmigen Poren sind am Grund jeder Rille lokalisiert und stellt den Kontakt mit dem Inneren des Sensillum her durch die Kanäle (Pfeile). Im Inneren befindet sich dendritische Zweige (Sternchen) welche in einer Flüssigkeit baden. Maßstab 0,2 μm . Alle Bilder sind von Shields und Hildebrandt, 1999.

In der dendritischen Membran der OSNs liegen Rezeptoren, welche mit Duftstoffen interagieren und durch die Bindung eine neuronale Antwort hervorrufen (Benton, Vannice, Gomez-Diaz, & Vosshall, 2009). Bisher sind in Insekten drei Gruppen solcher Rezeptoren bekannt: Olfaktorische Rezeptoren (OR), Gustatorische Rezeptoren (GR) und Ionotrope Rezeptoren (IR). IRs sind anscheinend aus der Familie der Ionotropen Glutamaterezeptoren (iGluRs) abgeleitet. iGluRs sind eine stark konservierte Familie ligandengesteuerter Ionenkanäle, welche extrazelluläres Glutamat, sowie verwandte Liganden detektieren (Croset et al., 2010). Der Hauptunterschied zwischen IRs und iGluRs liegt in der Ligandenbindedomäne, IRs fehlen für die Bindung von Glutamat kritische Aminosäure (Abb. 2). IRs werden in zwei Unterfamilien unterschieden: die konservierten antennalen IRs und die speziesspezifischen divergenten IRs. Es wird Vermutet, dass einige der divergenten IRs in den gustatorischen Neuronen exprimiert werden, und keine Rolle für den Geruchssinn spielen (Croset, et al., 2010).



Abb. 2 Schematische Darstellung von iGluR (links) und IR (Rechts) – Es ist zu sehen, dass bei dem IR die Aminoterminal-Domäne fehlt, welche für die Bindung von Glutamat verantwortlich ist. Beim IR ist nur ein kurzer extrazellulärer Aminoterminus vorhanden.

Antennale IRs werden in OSNs in Sensilla coeloconica exprimiert. Generell sind antennale IRs dabei nicht mit Rezeptoren anderer chemosensorischer Familien koexprimiert, (Croset, et al., 2010). Im Gegensatz zu GRs und ORs sind IRs stark konserviert (Croset, et al., 2010) und unterliegen anscheinend einem höheren Selektionsdruck. Sie sind weiterhin evolutionär alt, im Gegensatz zu den insektenspezifischen ORs existieren IRs generell in Protostomia (Croset, et al., 2010).

Antennale IRs bilden anscheinend einen Rezeptorenkomplex mit anderen antennalen IRs, wobei jeder Partner untereinheitenabhängige Charakteristika vermittelt (Croset, et al., 2010). IR8a und IR25a übernehmen dabei wahrscheinlich eine Rolle als generelle Co-Rezeptoren (Benton, et al., 2009). Der IR25a repräsentiert wahrscheinlich das älteste Mitglied dieser Rezeptorengruppe. Untersuchungen zufolge entstand die Vermutung, dass die IRs die erste olfaktorischen Rezeptor Familie in Insekten bildete (Croset, et al., 2010).

Bisher fanden alle Arbeiten zur Erforschung der IRs, in *D. melanogaster* statt. In Lepidoptera ist neben einer Identifikation in *B. mori* (Croset, et al., 2010) und in *Spodoptera littoralis* (Olivier, Monsempes, Francois, Poivet, & Jacquin-Joly, 2011) nichts bekannt. Um diese Rezeptoren weitere Untersuchung in *M. sexta* zugänglich zu machen haben wir die antennale Expression von IR kodierenden Genen untersucht.

Zunächst wurden bioinformatisch die Verwandtschaftsbeziehung von aus vorhandenen Genomdaten abgeleiteten Kandidatengene zu bekannten IRs untersucht. Im folgendem wurden genspezifische Primer erstellt um mittels der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) und antennaler cDNA die Expression in der Antenne zu beweisen. Zur räumlichen Lokalisierung der Expression wurde eine RNA-*in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Abschließend sollte mittels einer Doppel-*in-situ*-Hybridisierung festgestellt werden, ob die Ionotropen Rezeptoren in anderen Zellen als die der ORs exprimiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. S6014
Natriumcarbonat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. S7795
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 9265.2
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 3904.1
Natriumphosphat dibasisch Dihydrat	Riedel de Haen Art. Nr. 30412
Natriumcitrat	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. S1804
TRIS	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 5429.37
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 2189.1
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 0335.2
Triton x 100	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. 019K0151
Formamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 6749.3
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. HN10.1

Substanz	Hersteller
Mangan(II)-Chlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. T881.3
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 5239.1
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. HN02.1
Hexamincobalt Chlorid	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. H7891-5G
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. M92.1
SOB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. AE27.1
D – (+) – Glucose	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. 1724615
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. A994.2
Ampicillin Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. K029.2
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 6251.1
X- β - Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 2315.4
Salzsäure 37 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 9277.1
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 9065.1
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 7332.2
Trypton	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 8952.2

Substanz	Hersteller
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 2363.3
Tween20	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. P1379
Coprecipitant	Bioline, London, Großbritannien, Art. Nr.: PP-103H
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. A512.1
DEPC	Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. K028.3
Heringssperma	Invitrogen, Carlsbad, CA, Art. Nr.: 74782
Glycerin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. Nr. 635685
Dextransulfat	Calbiochem, EMD Biosciences, Inc., San Diego, USA, Art. Nr. 265152

2.1.2 Größenmarker DNA

2-Log DNA Ladder	New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, Art. Nr.:#N3200S
------------------	---

2.1.3 Enzyme, Kits, Plasmide

Enzym, Kit, Plasmid	Hersteller
NEBuffer 4	New England BioLabs Art. Nr. #B7004S
BSA 100x	New England BioLabs Art. Nr. #B9001S
Biotin RNA labeling Kit	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 11685597910

Enzym, Kit, Plasmid	Hersteller
Digoxigenin RNA labeling Kit	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 11277073910
Anti-Digoxigenin AP Fab fragments	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 11093274910, Lot. Nr.: 12486522
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, Art. Nr.: D2501-02
E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I	Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, GA, Art. Nr.: D6942-02
HNPP Fluorescent Detection Set	Roche, Basel, Schweiz, Art. Nr.: 11758888001, Lot. Nr.: 13053100
Taq Polymerase (5U/ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland, Art. Nr.: 201207
TOPO TA Cloning Kit Dual Promoter (mit pCRII-TOPO Vektor)	Invitrogen, Carlsbad, CA, Art. Nr.: 45-0007LT, Lot. Nr.:1029354
TSA TM Fluorescein System	Perkin Elmer, Waltham, MA, Art. Nr.: NEL701A001KT

2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer

Puffer, Medium, Lösung	Zusammensetzung
0,1 M Natriumbicarbonat	8,4g Natriumbicarbonat 1 Liter Aqua bidest Autoklavieren bei 121 °C pH Wert auf 9,5 mit 0,1M Natriumcarbonat
0,1 M Natriumcarbonat	10,6g Natriumcarbonat 1 Liter Aqua bidest Autoklavieren bei 121 °C

Puffer, Medium, Lösung	Zusammensetzung
10x PBS Phosphat Bufferd Saline	85g 8,5% Natriumchlorid 14,2g 80mM Kalium Dihydrogen Phosphat 14,2g 14mM Natrium Phosphat 1 Liter Aqua bidest pH 7,1 Autoklavieren bei 121°C
20XSSC	175,3g 3M Natriumchlorid 88,2g 0,3M Natriumcitrat 1 Liter Aqua Bidest pH Wert auf 7,1 mit HCL Autoklavieren bei 121°C
1M TRIS	TRIS 121,13g 1 Liter Aqua bidest pH-Wert 9,5 mit HCL
2,5M Natriumchlorid	46,1g Natriumchlorid 1 Liter Aqua bidest
1M Magnesiumchlorid	203,3g Magnesiumchlorid Hexahydrate 1 Liter Aqua bidest
Fixation Solution	150ml Natriumbicarbonat (0,1M Stammlösung) 8g 4% Paraformaldehyd Über Nacht im Wasserbad lösen (56°C) Auf 200ml mit Natriumcarbonat auffüllen pH auf 9,5 mit 0,1M Natriumcarbonat
1xPBS	100ml 10xPBS (Stammlösung 10xPBS) 900ml Aqua bidest.

Puffer, Medium, Lösung	Zusammensetzung
1xPBS 1%Triton	20ml 10xPBS (Stammlösung 10xPBS) 2ml 1% Tritonx100 178ml Aqua bidest.
0,1 x SSC	5ml 20xSSC (Stammlösung 20xSSC) 1 Liter aqua bidest
Detections Puffer	100ml 1M TRIS 40ml 2,5M Natriumchlorid 10ml 1M Magnesiumchlorid Auf 1l mit Aqua bidest auffüllen pH auf 8,0 mit HCL
50% Formamid	50ml Formamid 50ml Aqua bidest
50% Formamid – 5xSSC	100ml Formamid 50ml 20xSSC (Stammlösung 20xSSC) 50ml Aqua bidest
SOB Medium	13,32g SOB-Medium 500ml Aqua Bidest
SOC Medium	0,36g Glucose 100ml SOB (Stammlösung SOB)
1000x Ampicillin	1g Ampicillin Natriumsalz 100ml Aqua bidest.
1000x X-Gal	80mg X-Gal 2ml Demethylformamid
LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % Natriumchlorid pH 7,5

Puffer, Medium, Lösung	Zusammensetzung
LB-Agar	200 ml LB-Medium 1,5 % Agar 400 µl Ampicillin (50 mg/ml) 500 µl X-Gal
Hybridisierungspuffer	10 % Dextransulfat 2 x SSC (aus 20 x SSC) 0,2 mg/ml Heringssperma 50 % Formamid; pro 50 ml 20 mg/ml Yeast-t-RNA DNA; pro 200 µl Aqua bidest
Ladepuffer	2,5 mg Bromphenolblau 30 % Glycerin 70 % destilliertes Wasser

2.1.5 Analyse-Software und Bearbeitungs-Software

Software	Hersteller
LSM Image Browser	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Konfokal Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
FigTree	Andrew Rambaut, Edinburgh, England
FastTree2	Morgan N. Price
Seqman	DNAStar, Madison, USA
Inkscape	Inkscape.org

2.1.6 Geräte und Laborausstattung

Gerät	Name/Typ	Hersteller
Zentrifuge	5430R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Schüttler	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY)
Thermocycler	PCR System 9700	Applied Biosystems (Carlsbad, CA)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waage	PB3002-S Delta Range	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Plattformschüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer	Electronicrührer	VarioMag, USA
Pipetten	Pipetman	Gilson (Middleton, WI)
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Brutschrank	Heraeus	Thermo Fisher Scientific
Inkubationsschüttler	Thermomixer comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Konfokal Laser Scanning Mikroskop	LSM 510 Meta	Zeiss, Jena, Deutschland
Cryostat	Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad	SW22	Julabo, Seelbach, Deutschland
Destille	Mono Dest 3000E	Lenz Laborglas, Wertheim, Deutschland

Gerät	Name/Typ	Hersteller
Klima Kammer	MC 1000	Snijders Scientific, Tilburg, Niederlande
Autoklav	MLS 3781 L	Sanyo, Moriguchi City, Japan
Hybridisierungssofen	Hybaid	Thermo Fisher Scientific
Elektrophoresekammer	Mupid One	Advance, Tokyo, Japan

2.1.7 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Objektträger	Therma scientific, Menzel Gläser, Roth, Karlsruhe, D; VWR International Ltd. Polysine™, Leighton Buzzard, UK
Deckgläser	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.8 Versuchstiere

Die Motten *M. sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) wurden im Institut für chemische Ökologie der Max-Planck-Gesellschaft gezüchtet. Die ausgewachsenen Motten hatten die Möglichkeit sich in einem Flugkäfig zu paaren. In diesen Käfig befand sich die Pflanze *Nicotiana attenuata*, welche zur Eiablage benutzt wurde. Die Eier wurden dreimal pro Woche abgesammelt und in Plastikboxen in eine Klimakammer (Tag: 26 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht, 100 % Lichtintensität; Nacht: 22 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit, 8 h dunkel) überführt. Nach schlüpfen der Larven wurden diese in neue Plastikboxen in der gleichen Klimakammer übertragen und mit künstlicher Ernährung versorgt (46 g Agar, 144 g Weizenkeime, 140 g Maismehl, 76 g Sojamehl, 75 g Kasein, 24 g Salz, 36 g Zucker, 5 g Cholesterin, 12 g Ascorbinsäure, 6 g Sorbinsäure, 3 g Methylparaben, 9 ml Leinöl, 60 ml 37 % iges Formalin, 30 mg Nikotinsäure, 15 mg Riboflavin, 7 mg Thiamin, 7 mg Pyridoxin, 7 mg Folsäure und 0,6 mg Biotin je 1,8 ml Wasser). Die Larven wurden dreimal pro Woche in neue Boxen mit neuem Futter übertragen. Am Ende des letzten Larvenstadiums wurden die Larven

in Holz gebohrten Löchern in einer anderen Klimakammer, bei gleichen Bedingungen, für die Verpuppung platziert. Die für die Aufzucht ausgewählten Puppen wurden in den Flugkäfig gebracht, während die Versuchstiere, nach Geschlechtern getrennt, in Papiertüten schlüpfen.

2.2 Methoden

2.2.1 Sequenzanalyse

Zum Abgleich der vorhergesagten Proteinsequenzen für IRs von *M. sexta*, mit *B. mori* und *D. melanogaster* wurde MAFFT (von Kazutaka Katoh) verwendet, gefolgt von einer Approximately-Maximum-Likelihood Analyse mit FastTree 2. Die vorhergesagten Sequenzen stammen aus dem Manduca Genom, welche von Dr. E. Große-Wilde annotiert wurden. Anschließend wurde mit diesen Daten und FigTree das Dendrogramm erstellt und mit Inkscape bearbeitet.

2.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Das Primerdesign für die PCR wurde mit Hilfe von ePrimer3 entworfen. Die entsprechenden Oligonukleotide hat Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) hergestellt (Tab. 2).

Die gefrieretrocknet gelieferten Primer wurden zu einer Konzentration von 100 pmol/ μ l nach Angaben des Herstellers gelöst. Für die anschließende RT-PCR wurde die Stammlösung 1:10 verdünnt.

Für den PCR-Ansatz wurden dNTP-Mix, 10 x PCR Puffer und die Primer aufgetaut und gegebenenfalls auftretende Präzipitate in Wärme gelöst. Vor dem Pipettieren wurden diese kurz geschüttelt und zentrifugiert. Der PCR-Ansatz (Tab. 1) wurde in ein 0.2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde das Gefäß in den Thermocycler gegeben. Bei der cDNA handelt es sich um antennale cDNA von adulten Tieren.

Tab. 1 Ansatz für RT-PCR

	Volumen
Aqua bidest	17,5 µl
10 x PCR Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix	1 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
cDNA	1 µl
Polymerase	1 µl
Gesamt	25 µl

Zur Amplifikation wurden die Proben zunächst für 5 min auf 94 °C erhitzt darauf folgten 30 Zyklen mit 94 °C für 30 Sekunden, 55-62 °C für 30 Sekunden und 72 °C für 2 min. Danach wurde die Temperatur von 72 °C für 10 min gehalten und abschließend auf 4 °C gekühlt.

Tab. 2 Übersicht der Primer und ihrer Anlagerungstemperatur

Gen	Primer	Sequenz	T_M[°C]
IR8a	IR8afor	CAACCCCGACGCGTATCCGTATCC	67,8
	IR8arev	TTACGGCCTATATTCATTTTTAGGAAAAAC GCTTATATATG	65,4
IR40a	IR40afor	GAGCGTCTCCAGGCCGTGGAATTC	67,8
	IR40arev	TCATATCCCATTTGCTGCTCCAGGTCC	66,5

Gen	Primer	Sequenz	T _M [°C]
IR41a	IR41afor	ATGACGTTAACGCCAGCACAGTTTTTTTCG	65,4
	IR41arev	TCATATTTCTATGACAGCGTGAACGCGAC	65,3
IR76b	IR76bfor	CATCCGCAGCTGGTTCTGGACTTTTG	66,4
	IR76brev	TTATCGATACAGAAAAGCAGAAGGCGCTC	65,3

2.2.3 Gel-Elektrophorese

Das Gel besteht aus Agarose, Tris-Acetat-EDTA-Puffer sowie destilliertem Wasser. Zunächst wurde für den 50x Tris-Acetat-EDTA-Puffer 242 g TRIS und 18,6 g EDTA eingewogen und 57,1 ml reine Essigsäure hinzugegeben und zum Schluss auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wurde der 50 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer 1:50 mit Aqua dest. verdünnt. Für das Gel wurden 2 g Agarose abgewogen und unter aufkochen in 200 ml des 1 x -Acetat-EDTA-Puffer gelöst. Nach dem aufkochen und Lösen der Agarose erfolgte die Hinzugabe von 5 µl Ethidiumbromid. Die Auftrennung der PCR Produkte erfolgte bei 135 V für 30 min.

2.2.4 Gelextraktion

Nach der Gelelektrophorese wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht ausgeschnitten. Um die DNA aus dem Gel zu extrahieren wurde das Kit von E.Z.N.A. verwendet. Zunächst wurde das Gel bei 60 °C in 300 µl Bindepuffer gelöst. Nach dem Lösen wurde die DNA/Agarose Lösung auf eine Säule gegeben und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden erneut 300 µl Bindepuffer hinzugegeben und bei 13.000 x g für 1 min zentrifugiert. Danach wurde die Säule zweimal mit 700 µl SPW Wasch Puffer für eine Minute bei 13.000 x g gewaschen. Dann erfolgte das Trocknen der Säule durch die Zentrifugation bei 20.817 x g für 2 Minuten. Zum Schluss wurde die DNA mit 30 µl Elutionspuffer, bei 20.817 x g für 1 min, über die Säule eluiert.

2.2.5 Erstellung kompetenter Zellen

Zunächst wurde mit einer Impföse *E. Coli* von einem Glycerol-stock gekratzt und anschließend auf einer SOB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Kolonien gepickt und es erfolgte die Beimpfung von 1 ml SOB-Medium welches 20 mM MgSO₄ beinhaltet. Nach dem dispergieren der Zellen wurde es zu 100 ml SOB Medium mit 20 mM MgSO₄ gegeben. Bei der anschließenden Inkubation bei 37 °C wurde alle halbe Stunde die optische Dichte bei 600 nm gemessen bis ein Wert von rund 0,4 erreicht wurde. Die Zellen wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis gestellt, danach wurden die Zellen bei 4 °C und 2.700 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Lösen der Zellen erfolgte in 20 ml eiskalten FSB-Medium und 10 Minütiger Inkubation auf Eis. Danach erfolgte erneut eine 10 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 2.700 x g und das Verwerfen des Überstandes. Anschließend wurde 4 ml FSB Medium und 140 µl Dimethylsulfoxid hinzugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte das aliquotieren in Eppendorf Reaktionsgefäßen und das Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, danach wurden die Zellen bei – 80 °C gelagert.

2.2.6 Ligation

Das frische PCR-Produkt wurde für die Ligation verwendet. Nach dem die einzelnen Bestandteile wie in Tab 2 pipettiert wurden, wurde das Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tab. 3 Pipettierschema Ligationsansatz

Volumina	Stoff
3 µl	PCR-Produkt
0,5 µl	10x Ligationspuffer
1 µl	PCR II Vektor
0,5 µl	T4-DNA-Ligase

2.2.7 Transformation

Bei der Transformation wurden mittels Hitzeschock die Plasmide in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Zunächst wurden die Zellen, welche bei -80 °C gelagert wurden, in den Handflächen angetaut und für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 2,5 µl des Ligationsansatzes und die Inkubation für 30 min auf Eis. Danach kam der Ansatz für 90 sec in den Thermoblock bei 42 °C, anschließend folgte die Abkühlung für 2 min auf Eis und die Hinzugabe von 250 µl des SOC-Mediums. Im Anschluss wurde die Suspension für 45 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Zum Schluss erfolgte das Ausstreichen der Suspension auf eine Ampicillin-X-Gal-Agar-platte und die über Nacht Inkubation bei 37 °C.

2.2.8 Kolonie-PCR

Die Kolonien wurden von der Agarplatte gepickt und für eine Stunde in 100 µl LB Medium welches mit 5 µl Ampicillin 1000x versetzt war inkubiert. Und anschließend erfolgte der Selbe PCR-Ansatz wie in Tabelle eins anstatt cDNA wurde 1 µl des Inkubationsansatzes hinzugegeben.

2.2.9 Plasmidisolierung

Die gepickten Zellen wurden über Nacht in 5 ml LB-Ampicillin Medium inkubiert um dann die Plasmide der Zellen zu isolieren. Als erstes wurden die Zellen bei 4.000 x g für 15 min zum Pellet zentrifugiert und der Überstand verworfen und dann das Pellet in 250 µl RNase A Lösung resuspendiert. Anschließend erfolgte die Überführung der Suspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß und die Hinzugabe von 250 µl der Lösung 2. Nachdem eine klare Flüssigkeit entstand war, wurde zur Neutralisation 350 µl der Lösung 3 hinzu pipettiert wodurch weiße Flocken ausfielen. Dieser Ansatz wurde bei 20.817 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand auf eine Säule gegeben, welche mit 100 µl Equilibrationspuffer bei 13.000 x g für eine Minute vorbereitet wurde. Anschließend erfolgte Hinzugabe von Lösungen und Zentrifugationsschritte wie in Tabelle 4.

Tab. 4 Zentrifugationsschritte für die Eluierung der DNA

Schritt	Lösung	Volumen [μ l]	Zeit [min]	Umdrehung [g]
1	Puffer HB	500	1	20.817
2	DNA Wasch Puffer	700	1	20.817
3	DNA Wasch Puffer	700	1	20.817
4	-	-	2	20.817
5	Elutionspuffer	80	1	20.817

2.2.10 Sequenzierung

Die Plasmid-DNA wurde zur Sequenzierung zu Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) geschickt. Dazu wurden 750 ng Plasmid-DNA eingesetzt und mit aqua bidest. auf 15 μ l aufgefüllt.

2.3 *In-Situ* Hybridisierung

2.3.1 Synthese der Sonden

Zunächst wurde das Plasmid durch einen Restriktionsverdau linearisiert. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese und die Gelextraktion mit dem Kit von E.Z.N.A. (Siehe 2.2.4 Gelextraktion) der linearisierten DNA. Nun erfolgte die RNA-Synthese mit der Zusammensetzung wie in Tabelle 5 aufgeführt.

Tab. 5 Pipettierschema für die RNA-Synthese

Volumen	Stoff
x μ l (150ng)	Template
Y μ l	DEPC-Wasser

Volumen	Stoff
14 µl	x µl + y µl
2 µl	10 x Transkriptionspuffer
2 µl	RNA-Labeling-Mix
2 µl	RNA Polymerase

Anschließend wurde der Ansatz für 3 h bei 37 °C inkubiert. Danach folgte die Hinzugabe von 2,5 µl Copräzipitat und 75 µl 100 % Ethanol und die Ausfällung der RNA über Nacht bei - 20 °C.

Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgefäß bei 4 °C für 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Hinzugabe von 50 µl eiskalten 70 % Ethanol (20 °C) und suspendieren des Pellets wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Danach wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl RNase freiem Wasser gelöst. Anschließend erfolgte die RNA-Fragmentation mit 25 µl der Probe und 25 µl Fragmentationspuffer und einer Inkubation bei 60 °C. Mit der Formel von Angerer und Angerer (1) konnte die Inkubationszeit bestimmt werden.

$$Fragmentationszeit = \frac{\frac{AnzahlBasenProbe}{1000} - \frac{GewünschteFragmentlänge}{1000}}{\frac{0,11 * AnzahlBasenProbe}{1000} * \frac{GewünschteFragmentlänge}{1000}} \quad [1]$$

Zum Schluss wurden 5 µl einer Stopplösung (10 % Essigsäure) und 250 µl Hybridisierungspuffer hinzugegeben. Die Sonden werden bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C aufbewahrt.

2.3.2 Gewebeschnitte

Nach der Abtrennung der Antennen wurden diese kurz in einer Triton X-100 Lösung gewaschen und in ein Einbettungsmedium eingetaucht welches dann bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurde. Der gefrorene Block wurde im Kryostaten eingespannt und es wurden $20\text{ }\mu\text{m}$ Querschnitte der Antenne gemacht. Anschließend wurden die Schnitte auf speziell behandelte Objektträger überführt. Nach 30 min an der Luft wurde die Objektträger bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.3 RNA-Hybridisierung

Zunächst wurden die Sonden mit Hybridisierungspuffer 1:50 verdünnt. Für jeden Objektträger wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ benötigt, somit setzte sich die Verdünnung aus $96\text{ }\mu\text{l}$ Hybridisierungspuffer und $2\text{ }\mu\text{l}$ der jeweiligen Sonde zusammen. Danach erfolgte die Inkubation für 10 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließend für mindestens 5 min auf Eis.

Die Objektträger mit den Schnitten, welche bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagerten, wurden an der Luft getrocknet und anschließend für 30 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 200 ml Fixierlösung inkubiert.

Danach erfolgten die einzelnen Waschschrirte bei Raumtemperatur wie in Tab. 6, gefolgt von der 10 minütigen Inkubation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 50 % Formamid / 5 x SSC.

Tab. 6 Waschschrirte der Objektträger

Schritt	Lösung	Volumen	Zeit
1	1 x PBS	200 ml	1 min
2	0,2 M HCL	200 ml	10 min
3	1 x PBS – 1 % Triton	200 ml	2 min
4	1 x PBS	200 ml	30 sec
5	1 x PBS	200 ml	30 sec

Nach dem Trocknen der Objektträger und dem Einsortieren in eine Feuchtigkeitskammer, in der sich vollgesogener Zellstoff mit 50 % Formamidlösung befand, wurde 100 µl der Hybridisierungsprobe auf jeden Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Danach wurde die geschlossene Feuchtigkeitskammer über Nacht bei 55 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger in vorgeheizten 0,1 SSC (60 °C) für 10 min bei 60 °C inkubiert, anschließend erfolgten zwei weitere Waschstreitte für jeweils 30 min in einem Wasserbad bei 60 °C und neuem 0,1 SSC. Danach wurden die Objektträger kurz in 200 ml TBS (pH 7,5) gespült.

Nach dem Trocknen der Objektträger und dem Einsortieren in eine Feuchtigkeitskammer, worin sich mit Wasser vollgesogener Zellstoff befand, wurde 1 ml Blockpuffer auf jeden Objektträger pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde der Antikörper-Mix Pipettiert, dieser Bestand aus 1 ml Blockingpuffer, 2 µl Digoxigenin und 10 µl Straptavidin. Nach der Inkubation wurde der Puffer auf den Objektträger verworfen und 100 µl des Antikörper-Mix auf jeden Objektträger gegeben, welcher mit Deckgläschen abgedeckt wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation für mindestens eine Stunde bei 37 °C in einer Feuchtigkeitskammer.

Danach wurden die Objektträger dreimal in 200 ml TBST für jeweils 5 min gewaschen und danach kurz in ein Detektionspuffer getaucht. Während des Waschens wurde der Rote Farbstoff vorbereitet, dieser bestand aus 1300 µl DAP, 13 µl HNPP und 13 µl HNPP Fast Red, welcher nach dem Pipettieren Filtriert (0,2 µm] wurde. Nach Trocknung der Objektträger wurde auf jeden Objektträger 100 µl des Roten Farbstoff gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert.

Danach wurden die Objektträger dreimal für 5 min in TBST gewaschen und während des Waschens wurde die Tyramid Lösung vorbereitet, welche aus 1000 µl Amplifikationslösung und 20 µl Tyramid bestand. Nach dem Waschen und trocken wurden 100 µl der Tyramidlösung auf die Objektträger gegeben welche dann mit einem Deckgläschen abgedeckt wurden und für 30 min bei Raumtemperatur in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert wurde. Zum Schluss wurden die Objektträger noch

dreimal für 5 min TBST gewaschen und kurz in Aqua bidest. gespült. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden 50 µl PBS/Glycerol (1:3) auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nun erfolgte die Versiegelung mit Nagellack und die Lagerung bei 4 °C.

2.3.4 Konfokal Mikroskopie

Die hybridisierten Gewebeschnitte der Antennen wurden an einem Konfokalmikroskop gescannt. Die Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mittels der LSM510 Software.

3 Ergebnisse

3.1 Evolutionäre Beziehung antennotroper Rezeptoren

Zur Untersuchung der Sequenzähnlichkeit der potentiell für IRs kodierenden Gene von *M. Sexta* wurden die vorhergesagten Proteinsequenzen mit den Sequenzen ihrer Orthologe in *Bombyx mori* und *Drosophila melanogaster* aligniert, und mit FastTree2 eine Approximately-Maximum-Likelihood Analyse durchgeführt. Das Resultat dieser Analyse wurde als Dendrogramm dargestellt (Abb. 3).

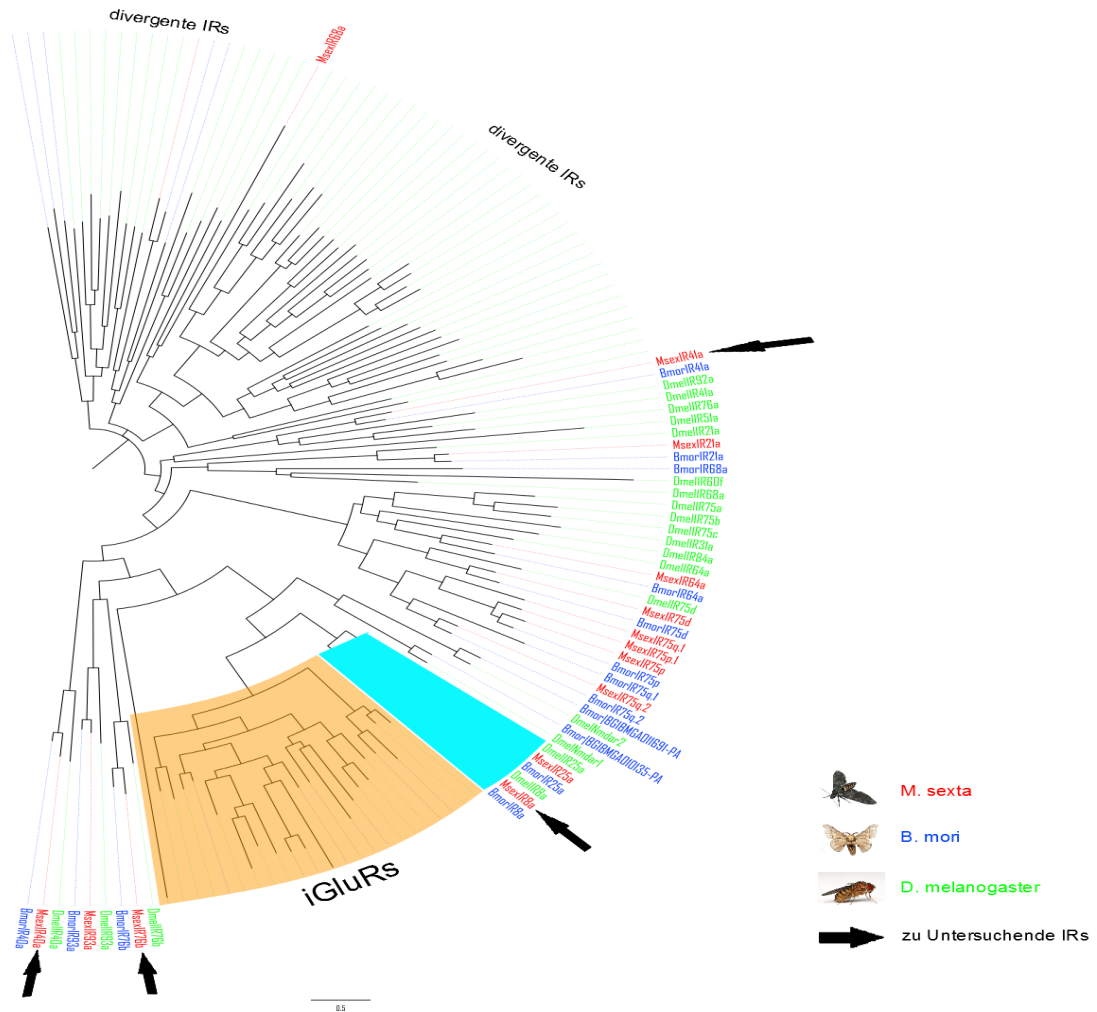


Abb. 3 Dendrogramm der antennotroper Rezeptoren – Dieser Baum stellt die evolutionäre Beziehung der antennotroper Rezeptoren in den Spezies *Drosophila melanogaster* (Grün), *Bombyx mori* (Blau) und *Manduca sexta* (Rot) dar. Orange sind die Ionotropen Glutamat Rezeptoren markiert und Blau die Co-Rezeptoren der IRs.

Die *M.sexta*-Sequenzen weisen hohe Ähnlichkeit zu den Referenzproteinen auf; sie sind klare Sequenzhomologe der IRs von *B. mori*. Alle IRs die in beiden Organismen vorkommen gruppieren mit entsprechenden antennalen Rezeptoren von *D. melanogaster*. Im Dendrogramm ist auch deutlich die Verwandtschaftsbeziehung der IRs zu iGLuRs zu sehen. Die im Dendrogramm mit Pfeilen markierten IRs wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

3.2 Charakterisierung antennaler ionotroper Rezeptoren

Zunächst wurde aus den genomischen Daten von *M. sexta* Gene abgeleitet, welche möglicherweise für antennal IRs kodieren. Vorhergesagte kodierende Gensequenzen wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus mit Sequenzen bekannter, antennale IRs kodierender Gene aus *Drosophila melanogaster* verglichen. Die Resultate der BLAST-Suche wurden genau analysiert, es wurden nur Sequenzen zur weiteren Verarbeitung gewählt, die den gesamten Genbereich des jeweiligen Referenzgenes ähnlich waren. Nach der Analyse der Datenbank wurde vier Sequenzen ausgewählt. Dies sind die für den IR8a kodierende Sequenz, welche eine Länge von 1084 Basenpaaren (bp) aufwies, IR40a (990 bp), IR41a (1815 bp) und IR76b(998 bp).

3.3 Quantitative Expressionsanalyse

Um die tatsächliche Existenz der bioinformatisch vorhergesagten Transkripte zu überprüfen wurden PCR-geeignete Primer entworfen die für die jeweiligen Transkripte spezifisch sind. Um ein geeignetes Template zu erhalten wurde RNA aus den Antennen isoliert und mittels einer Reversen Transkriptase und einem Poly-T Primer cDNA aus mRNA geschrieben. Dieses Template wurde mit den IR-spezifischen Primern in der PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 % Agarose-Gel aufgetragen, welches mit Ethidiumbromid versetzt war. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA und fluoresziert in diesem Zustand unter Anregung mit UV-Licht, ermöglicht also die Detektion von doppelsträngiger DNA im Gel. Der Lauf wurde bei 135 V für 30 min durchgeführt. Anschließend wurden die PCR Produkte mit Hilfe von Elektrophorese nach Ihrer Größe aufgetrennt (Abb. 4). Zum Vergleich ist links ein Marker mit Banden

bekannter Größe aufgetragen. In allen vier Fällen finden sich Banden der richtigen Größe. In allen Fällen wurden zeitgleich Reaktionen ohne Template (Negativkontrolle), mit genomischer DNA als Template durchgeführt. Beide sind nicht abgebildet. Die Negativkontrollen waren leer, in genomischer DNA waren keine Banden zu sehen, wahrscheinlich weil in allen vier Fällen die jeweils durch die Primer markierten Bereiche sehr weit voneinander entfernt lagen – IR kodierende Gene enthalten multiple Introns. Für die Amplifizierung des IR8a wurden zwei verschiedene Forward Primer verwendet, da zwei mögliche Genmodelle aus dem Genom abgeleitet wurden. Für IR8a_A ist kein PCR-Produkt entstanden, für IR8a_B existiert ein Produkt entsprechender Größe. Anhand der Stärke der Bande können wir grob die jeweilige Expressionsstärke abschätzen. IR8a und IR76b waren wesentlich stärker exprimiert als IR40a und IR41a. Alle Amplifikationen wurden mindestens dreimal durchgeführt, mit nahezu identischem Ergebnis.

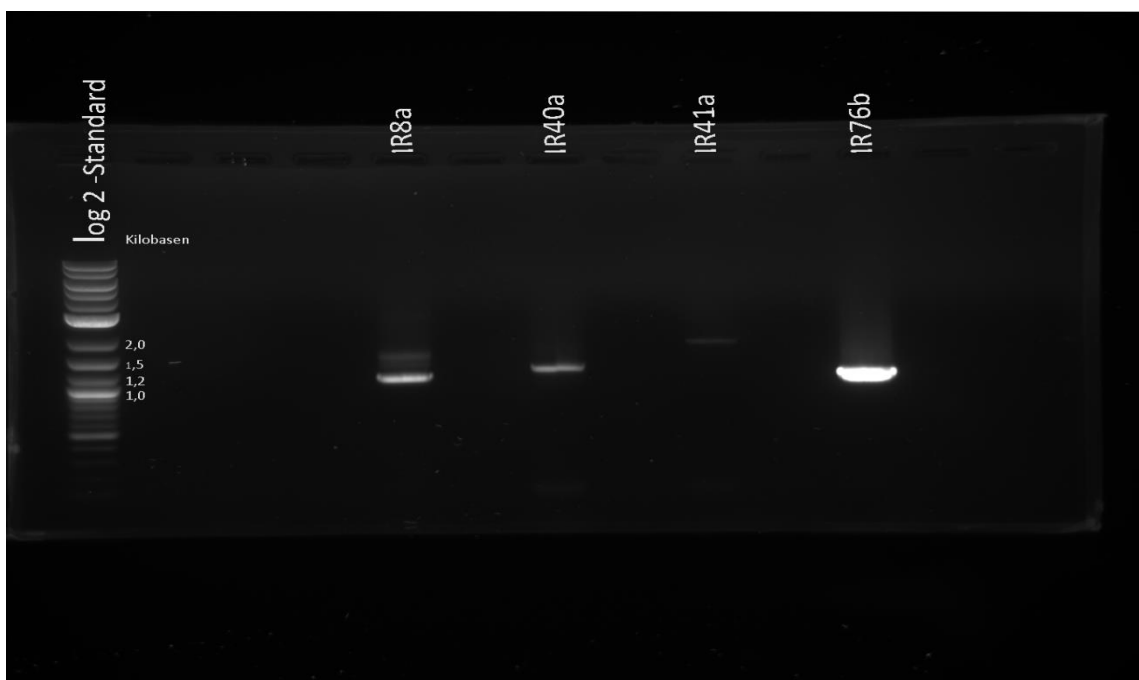


Abb. 4 Agarose-Gelbild der PCR-Produkte – Die Banden zeigen die PCR-Produkte der antennalen cDNA für die Primer IR8a, IR40a, IR41a und IR76b (v. l.). Die relevanten Größen des Markers (log₂ Standard) sind rechts von diesem dargestellt. Die anderen Spuren wurden frei gelassen.

Um zu überprüfen ob die Rezeptoren sowohl in Männchen als auch in Weibchen exprimiert werden wurde eine weitere PCR mit weiblicher und männlicher antennaler cDNA und unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Abb. 5). Es sind Banden sowohl bei männlicher als auch bei weiblicher cDNA zu finden. Fast alle Irs sind sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen annähernd gleich stark exprimiert. Die einzige Ausnahme ist IR41a, dessen Bande in Männchen wesentlich schwächer ist. Bei der Bahn für den IR8a in Männchen ist eine Doppelbande zu sehen, ebenso bei IR41 in Weibchen.

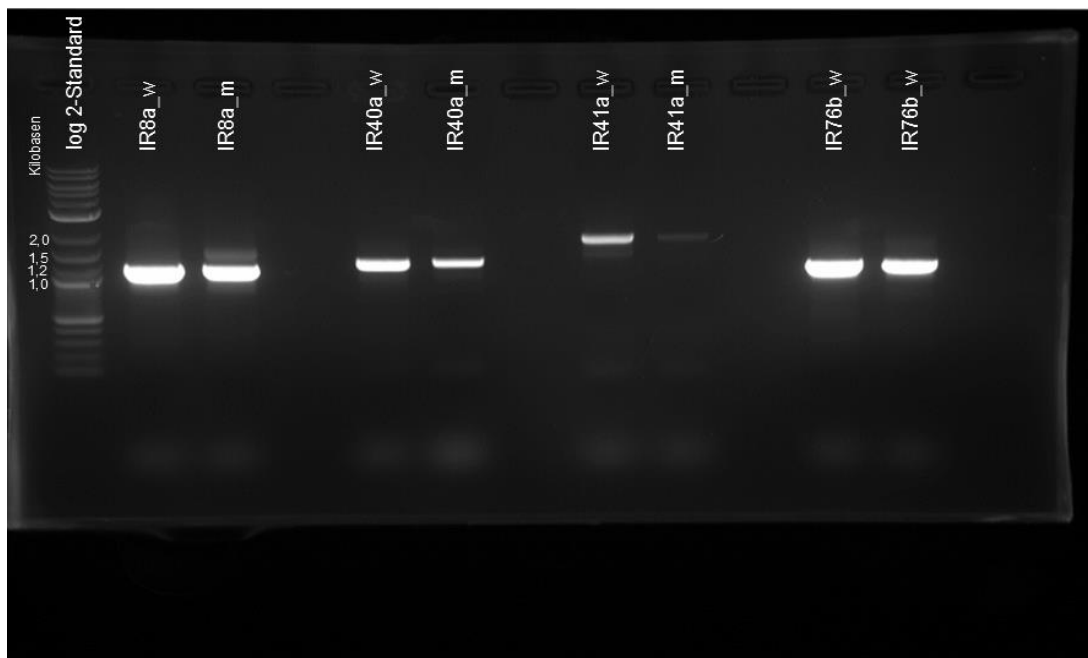


Abb. 5 Agarose-Gelbild der geschlechtsspezifischen PCR-Produkte – Die Banden zeigen die PCR-Produkte der antennalen cDNA für die Primer IR8a, IR40a IR41a und IR76b (v. l.) für weibliche (w) und männliche (m) cDNA. Die relevanten Größen des Markers (log 2 Standard) sind links von diesem dargestellt. Die anderen Spuren wurden frei gelassen.

3.4 Auswertung Sequenzierung

Um zu überprüfen ob die amplifizierten Abschnitte den bioinformatisch abgeleiteten Genen entsprechen, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Nach Extraktion der PCR-Produkte aus dem Gel wurden diese in einen PCR-Klonierungs-Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Nach dem Ausstrich zur Selektion wurden die weißen Kolonien, welche den Vektor und ein Insert enthielten, gepickt und für Plasmid Amplifikation und

Extraktion LB-Medium mit diesen Zellen beimpft. Bei der Mini Präparation der Zellen wurden die Konzentrationen (Tab 7) mittels der optischen Dichte bestimmt. Anhand der Konzentration konnte der Sequenzieransatz (siehe 2.2.10 Sequenzierung) pipettiert und an Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) zur Sequenzierung geschickt werden.

Tab. 7 Konzentration der Plasmide nach der DNA Extraktion

Genabschnitt	Konzentration
8a	369,1 ng/ μ l
40a	126,3 ng/ μ l
41a	132,1 ng/ μ l
76b	144,5 ng/ μ l

Die Sequenzierung verlief für die Rezeptoren des IR8a und des IR40a erfolgreich. Das Ergebnis der Sequenzierung des kodierenden Bereiches vom IR8a und IR40a stimmen zu großen Teilen überein (Abb. 6). Die Sequenzierung für den IR41a und den IR76b lieferten keine Ergebnisse und müsste wiederholt werden was aus Zeitgründen nicht möglich war.



Abb. 6 Ergebnis der Sequenzierung – In der jeweils ersten Zeile (MsexIR8a und MsexIR40a) sind die jeweils vorhergesagten Sequenzen in Form eines Balkens dargestellt. Die Übereinstimmungen der Amplifizierten DNA, in der mittleren Zeile für den forward Primer und in der letzten Zeile für den reverse Primer, zur vorhergesagten Sequenz sind als schwarzer Balken dargestellt und die Abweichung sind grau. Rosa sind die Abschnitte wo die Abweichungen zu groß sind, welche nicht für eine Auswertung zu gebrauchen sind. Als Roter Balken ist der Vektor zu sehen.

3.5 Räumliche Expression des Ionotropen Rezeptors 8a

Um das räumliche Expressionsmuster der Ionotropen Rezeptoren zu bestimmen wurde die Methode der fluoreszenten RNA-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) angewandt. Um die mRNA in den Zellen sichtbar zu machen werden komplementäre Sonden benötigt. Durch die Sequenzierung ist die Orientierung des Inserts im Plasmid bekannt, so dass die geeignete Polymerase bestimmt und zur Synthetisierung der Sonde eingesetzt werden konnte. Nach der Hybridisierung der Sonden mit der mRNA und dem Nachweis der Sonden konnten mit Hilfe eines Konfokalmikroskopes die Schnitte gescannt werden. Für diese Untersuchung wurde FISH mit einer Digoxigenin (DIG) markierten antisense RNA – Sonde von IR8a durchgeführt. Signale konnten in den Antennen unterhalb der Kutikula detektiert werden (Abb. 7).

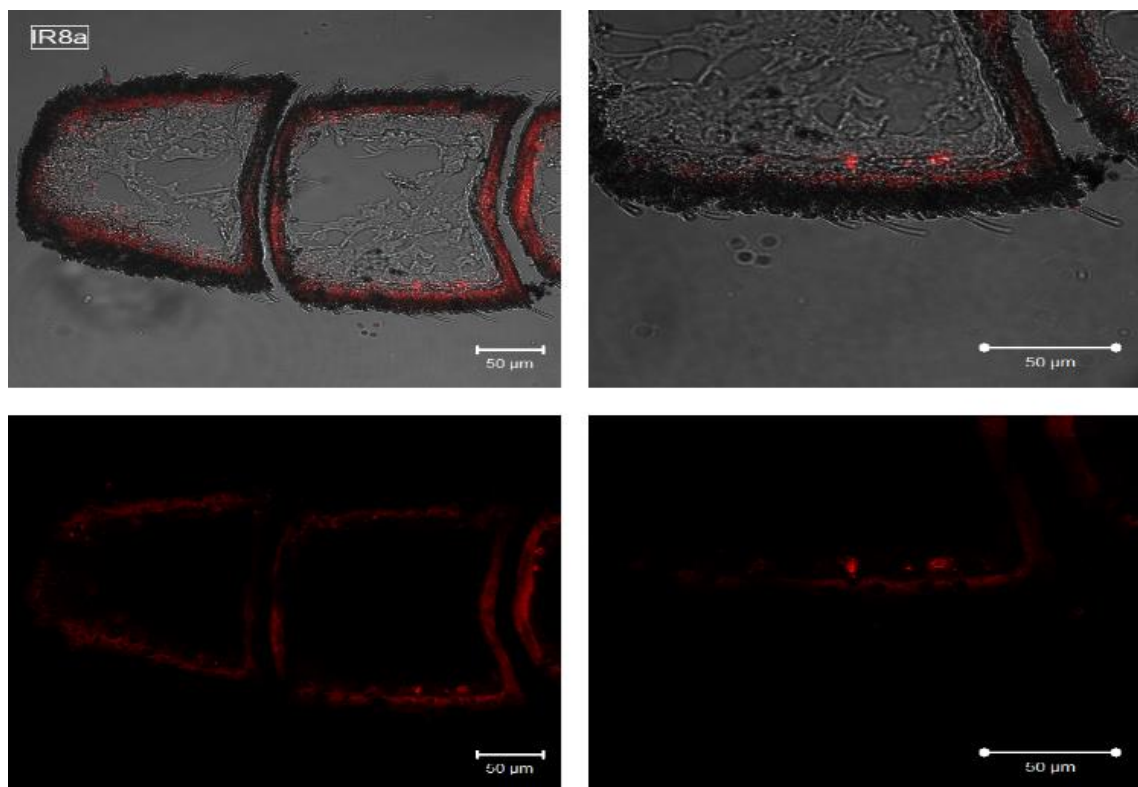


Abb. 7 Lokalisation des IR8a mittel *in-situ*-Hybridisierung in horizontalen Schnitten eins *M. Sexta* Weibchens – in der Abbildung sind Signale der DIG markierten IR8a Sonde zu sehen. Oben jeweils mit Durchlicht, unten nur die Fluoreszenz sowie links mit 100xfacher Vergrößerung und rechts 400xfache.

Bei *Drosophila melanogaster* werden IRs und ORCO nicht in denselben Zellen exprimiert (Benton, et al., 2009). Um zu analysieren ob das in *M. sexta* ebenfalls der Fall ist wurden Doppel *in-situ*-Hybridisierungen durchgeführt. Hierzu wurden die DIG-markierten IR8a Sonden zusammen mit Biotin markierten antisense RNA-Sonde gegen den Olfaktorischen Co-Rezeptor ORCO in FISHeingesetzt. Die beiden Markierungen wurden anschließend mit verschiedenen Methoden nachgewiesen. Es konnten sowohl ORCO-also auch IR8a-Signale unter der Kutikula der weiblichen Antenne von *M. Sexta* nachgewiesen werden (Abb. 8). Weiterhin ist zusehen das beide Rezeptoren in unterschiedlichen Zellen exprimiert werden.

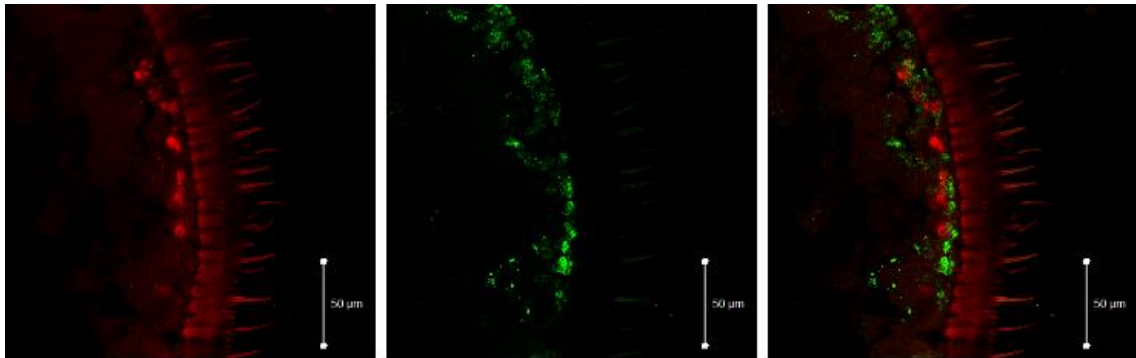


Abb. 8 Doppel *in-situ*-Hybridisierung des IR8a und ORCO – Links sind Signale der Digoxogenin markierten IR8a Sonde zu sehen. In der Mitte sind Signale der Biotin markierten ORCO Sonde zu sehen und rechts beide Signale zusammen.

4 Diskussion

Ursprung dieser Arbeit waren bioinformatisch aus Genomdaten von *Manduca sexta* abgeleitete Sequenzen. Von diesen wurde angenommen, dass sie Kandidaten für antennal exprimierte IRs kodieren. Die ursprüngliche Annotation der Sequenzen wurde aufgrund der von BLAST-Algorithmus basierendem Vergleich erstellt, um diese zu überprüfen wurde über eine phylogenetische Analyse die Beziehung der vorhergesagten Proteinsequenzen mit bereits bekannten IR-Proteinen untersucht. Hierdurch wurden die ursprünglichen Annotationen auf informatischer Ebene bestätigt. Es wurde als Hypothese angenommen, dass diese Sequenzen wie vorhergesagt existieren und weiterhin in der Antenne exprimiert sind. Um diese Hypothese zu untersuchen wurde RT-PCR mit genspezifischen Primern auf Basis von vier ausgewählten Kandidaten durchgeführt, unter Verwendung von antennaler cDNA von adulten Tieren als Template. Alle vier Primerpaare führten zur Amplifikation von Fragmenten korrekter Größe, es ist dementsprechend anzunehmen dass die jeweiligen Sequenzen existieren und in der Antenne exprimiert werden. Um die Identität der Amplifikate zu bestätigen wurden diese kloniert. Für Klone der IR8a und IR40a Amplifikate wurde innerhalb dieser Arbeit Sequenzdaten erhalten, diese bestätigen in beiden Fällen das die korrekten Genabschnitte mit wenigen abweichenden Einzelnukleotiden amplifiziert wurden. Die Abweichungen sind dadurch zu erklären, dass für die Arbeiten ein anderer Stamm als der den Genomdaten zugrunde liegende verwendet wurde. Weiterhin wird *M. sexta* als jährlich aus Wildfängen aufgefrischter Stamm gehalten, weswegen dieser eine größere Heterozygotität aufweist als für Inzeststämme wie üblicherweise z.B. für *D. melanogaster* verwendet der Fall ist. Die von uns gefundenen Variationen liegen im Bereich natürlicher Variation eines Gens.

Obwohl die verwendete Methode qualitative und nicht quantitative Daten liefert ist aufgrund der deutlichen unterschiedlichen Amplifikat-Menge anzunehmen, dass die verschiedenen IR-Typen unterschiedlich stark exprimiert werden. So führt die Amplifikation von IR8a und IR76b zu deutlich mehr Produkt als in den anderen beiden Fällen. Dies würde konform gehen mit der Beobachtung, dass z.B. in *D. melanogaster* nicht alle IRs in gleichen Mengen von Zellen vorkommen. *D. melanogaster* exprimiert

in einzelnen Neuronen zwischen einem und drei verschiedenen IRs. Es gibt vier verschiedene Gruppen welche zwei oder drei IRs beinhalten, in allen vier Gruppen kommt der IR76b vor (Benton, et al., 2009). Der IR8a stellt einen Co-Rezeptor dar, was bei diesem Rezeptor die Erklärung für ein erhöhtes Produkt ist. Natürlich müssen diese Hypothesen durch Folgeexperimente wie z.B. qPCR überprüft werden.

Obwohl die Sequenzierung bestätigte das der IR8a korrekt ist, ist eine Doppelbande zu sehen, wobei die obere Bande aus Zeitgründen nicht Sequenziert werden konnte. Es ist anzunehmen, dass in der oberen Bande ein Intron im Genabschnitt vorhanden ist, welches durch fehlerhaftes Spleißen nicht herausgeschnitten wurde. Eine andere Möglichkeit wäre das in diesem Amplifikationsprodukt ein zusätzliches Exon im Gen vorkommt und so eventuell eine andere Funktionalität besitzt. Dies müsste mit einer Doppel-*in-situ*-Hybridisierung untersucht werden.

Der IR41a deutet auf Geschlechtsspezifität hin da das Amplifikationsprodukt der männlichen cDNA geringer ist als das des Weibchens. Dadurch dass dieser in beiden Geschlechtern exprimiert wird, spielt dies keine zentrale geschlechtsspezifische Rolle. Bei den anderen Kandidaten besteht keine Geschlechtsspezifität, man kann sagen dass diese Rezeptoren womöglich nicht für die Verhaltensweisen in der Fortpflanzung verantwortlich sind wie etwa Pheromonrezeptoren.

Da diese Rezeptoren dennoch stark konserviert sind (Benton, et al., 2009), müssen sie essentiell für andere lebenserhaltende Verhaltensweisen sein, wie etwa der Futtersuche. Da in *D. melanogaster* der Corezeptor IR8a zusammen mit dem IR84a Phenylacetaldehyd detektiert (Abuin et al., 2011), was eine aromatische Verbindung ist, liegt die Vermutung nah das diese Rezeptoren unter anderem der Futtersuche dienen. Da die IRs keine Bindestelle für Glutamat besitzen (Benton, et al., 2009), sind sie vermutlich für die Detektion von chemischen Stoffen welche kein Glutamat beinhalten verantwortlich. Es wäre auch denkbar das sie chemische Stoffe welche Glutamat besitzen an anderen Stellen binden und somit andere Signalwege und andere Verhaltensweisen auslösen.

In *D. melanogaster* werden IRs nicht wie andere olfaktorische Rezeptoren z.B. ORs in basiconischen und trichoiden Sensillen exprimiert sondern in den Sensilla coeloconica (Benton, et al., 2009). Die Sensilla coeloconica der Antenne befinden sich bei *M. sexta* hauptsächlich auf der Oberfläche der Dorsalseite der Antenne, wenige befinden sich auf der Ventralseite. Diese Sensillen treten in deutlich geringeren Mengen als die anderen Sensillen Typen (basiconischen und trichoide Sensillen) auf (Shields & Hildebrand, 1999b). Somit wurde als Hypothese angenommen dass auch in *M. sexta* die ionotropen Rezeptoren in den sensorischen Neuronen der Sensilla coeloconica exprimiert werden und das sie sich somit hauptsächlich auf der Dorsalseite der Antenne befinden. Weiterhin wurde angenommen das der IR8a nicht in den selben sensorischen Neuronen wie der ORCO exprimiert wird und in wesentlich weniger Zellen. Um die erste Hypothese zu untersuchen wurde eine *in-situ*-Hybridisierung durchgeführt.

Mit der *In-situ*-Hybridisierung konnte bestätigt werden dass der IR8a in der Antenne exprimiert wird. Dieser Rezeptor wird in sensorischen Neuronen unterhalb der Kutikula exprimiert und befindet sich auf der Dorsalseite der Antenne. Um zu bestätigen dass dieser Rezeptor tatsächlich in sensorischen Neuronen der Sensilla coeloconica exprimiert wird, werden Mutanten benötigt welche ausschließlich Sensilla coeloconica besitzen und welche die keine besitzen. Was zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung allerdings noch nicht möglich ist. Um die weitere Hypothese zu belegen das ORs und IRs nicht in denselben Zellen exprimiert werden, wurde eine Doppel-*in-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Es ist deutlich zusehen, dass der IR8a nicht in denselben sensorischen Neuronen wie der ORCO exprimiert wird, was die angenommene Hypothese bestätigt. Der IR8a wird in wesentlich weniger Zellen exprimiert als der ORCO, da in den Antennen von *M. sexta* deutlich weniger Sensilla coeloconica als andere Sensillentypen vorhanden sind (Shields & Hildebrand, 1999b).

5 Literaturverzeichnis

- Abuin, L., Bargeton, B., Ulbrich, M. H., Isacoff, E. Y., Kellenberger, S., & Benton, R. (2011). Functional architecture of olfactory ionotropic glutamate receptors. *Neuron*, *69*(1), 44-60.
- Benton, R., Vannice, K. S., Gomez-Diaz, C., & Vosshall, L. B. (2009). Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, *136*(1), 149-162.
- Butenandt, A., Backmann, R., Stamm, D., & Hecker, E. (1959). Concerning the sexual attractant of the silkworm *Bombyx mori*. Purification and composition. *Z Naturforschg* 14b: 283-284
- Croset, V., Rytz, R., Cummins, S. F., Budd, A., Brawand, D., Kaessmann, H., et al. (2010). Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction. *PLoS Genet*, *6*(8), e1001064.
- Goyret, J., Kelber, A., Pfaff, M., & Raguso, R. A. (2009). Flexible responses to visual and olfactory stimuli by foraging *Manduca sexta*: larval nutrition affects adult behaviour. *Proc Biol Sci*, *276*(1668), 2739-2745.
- Hallem, E. A., Dahanukar, A., & Carlson, J. R. (2006). INSECT ODOR AND TASTE RECEPTORS. *Annual Review of Entomology*, *51*(1), 113-135.
- Hildebrand, J. G., & Shepherd, G. M. (1997). MECHANISMS OF OLFACTORY DISCRIMINATION: Converging Evidence for Common Principles Across Phyla. *Annual Review of Neuroscience*, *20*(1), 595-631.
- Lee, J. K., & Strausfeld, N. J. (1990). Structure, distribution and number of surface sensilla and their receptor cells on the olfactory appendage of the male moth *Manduca sexta*. *J Neurocytol*, *19*(4), 519-538.
- Olivier, V., Monsempe, C., Francois, M. C., Poivet, E., & Jacquin-Joly, E. (2011). Candidate chemosensory ionotropic receptors in a Lepidoptera. *Insect Mol Biol*, *20*(2), 189-199.
- Pierce, N. E., Braby, M. F., Heath, A., Lohman, D. J., Mathew, J., Rand, D. B., et al. (2002). THE ECOLOGY AND EVOLUTION OF ANT ASSOCIATION IN THE LYCAENIDAE (LEPIDOPTERA). *Annual Review of Entomology*, *47*(1), 733-771.
- Rezaval, C., Fabre, C. C., & Goodwin, S. F. (2011). Invertebrate neuroethology: food play and sex. *Curr Biol*, *21*(23), R960-962.
- Rospars, J. P. (1988). Structure and development of the insect antennodeutocerebral system. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, *17*(3), 243-294.
- Sanes, J. R., & Hildebrand, J. G. (1976). Structure and development of antennae in a moth, *Manduca sexta*. *Dev Biol*, *51*(2), 280-299.
- Shields, V. D. C., & Hildebrand, J. G. (1999a). Fine structure of antennal sensilla of the female sphinx moth, *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae). I. Trichoid and basiconic sensilla. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, *77*(2), 290-301.

- Shields, V. D. C., & Hildebrand, J. G. (1999b). Fine structure of antennal sensilla of the female sphinx moth, *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae). II. Auriculate, coeloconic, and styliform complex sensilla. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 77(2), 302-313.
- Vosshall, L. B., & Stocker, R. F. (2007). Molecular Architecture of Smell and Taste in *Drosophila*. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 505-533.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bill S. Hansson als Leiter der Abteilung, der es mir ermöglichte meine Arbeit in seiner Abteilung zu schreiben.

Ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Ewald Große-Wilde der es mir ermöglichte an diesem interessanten Thema zu forschen, sowie für die unermüdliche Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Christopher König für seine hilfreiche und fürsorgliche Betreuung bei Experimenten und dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

In diesem Sinne möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Kollegen aus dem Molekularbiologie Labor bedanken:

Sascha Bucks, Christine Mißbach, Katrin Groh und Christian Kliner

für ihre Unterstützung und Ratschläge.

Ein besonders Großer Dank gilt vor allem auch meinen Eltern, die mich während meines Studiums immer unterstützt haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit selbständig verfasst und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt, nur die angegebenen Quellen benutzt und die in den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Jena, den 11. Oktober 2013

Robert Schwarz